

令和元年度感染症危機管理研修会
2019年10月10日



百日咳の検査診断

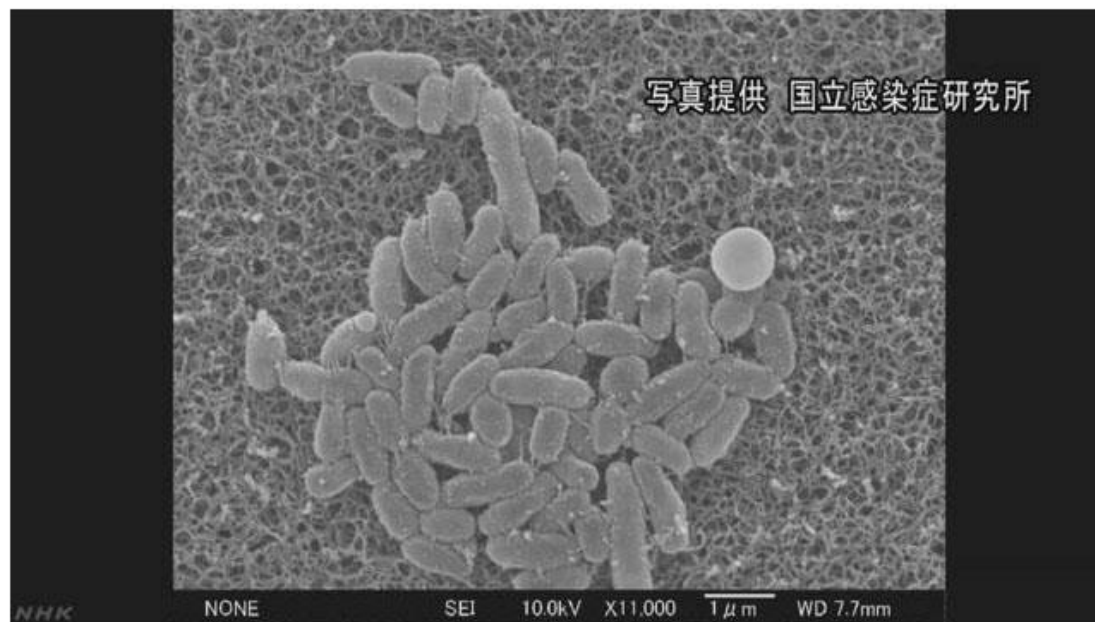
国立感染症研究所
細菌第二部 蒲地一成

「百日せき」の患者1万人超す 予防接種や 早めの受診を

2019年8月16日 13時30分

2019.8.16

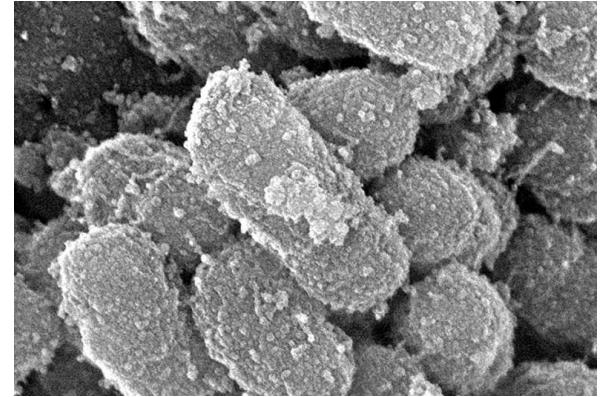
子どもを中心に激しいせきを繰り返す「百日せき」の患者が増え続け、ことしの患者数はこれまでに1万人を超えました。国立感染症研究所は重症化するおそれがある赤ちゃんへの感染を防ぐため、予防接種や早めの医療機関の受診を呼びかけています。



百日せきは激しいせきが続く、細菌が原因の感染症で、特に生後6か月未満の赤ちゃんがかかると、肺炎を引き起こすなど重症化し、死亡するおそれもあります。

百日咳とは？

- 百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって起こる急性呼吸器感染症
- 主な症状は長期の咳（遷延性咳嗽）であり，乳児で重篤化し易い
- 百日咳類縁菌（パラ百日咳菌，*Bordetella holmesii*）も起因菌となるが，その症例数は少ない



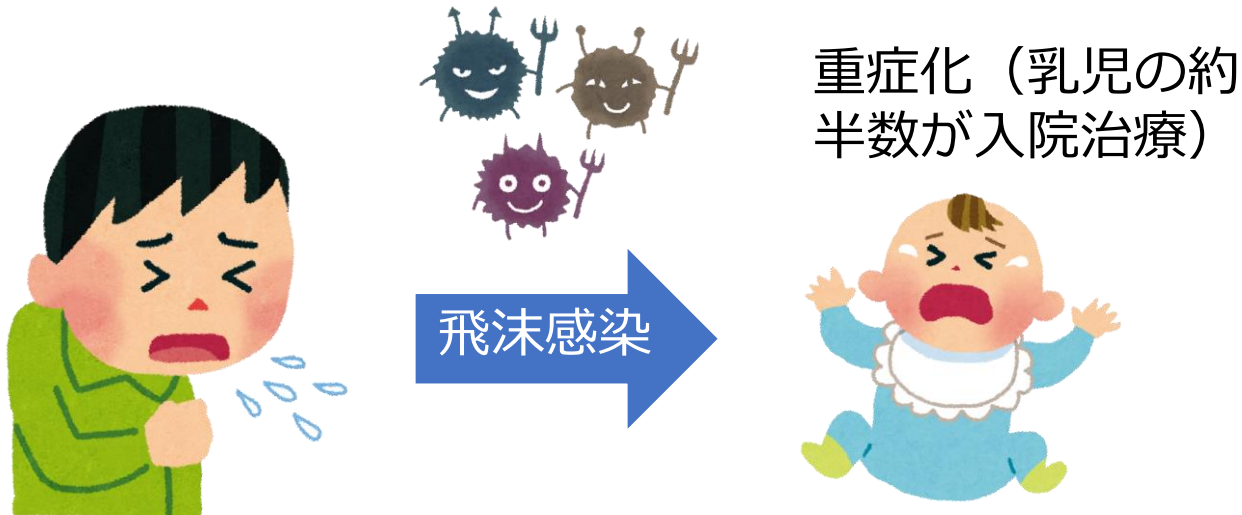
百日せきワクチン

- 百日咳はワクチン予防可能疾患の一つであり、現在4種混合ワクチン（DPT-IPV）が小児期に計4回接種されている
- 百日せきワクチンの免疫持続期間は4～12年のため、小学校高学年以降は感性者となる



百日咳の問題点

- 百日咳菌は高い感染力を有するため、家族内感染や集団感染を容易に引き起こす（基本再生産数 = 16~21）
- 青年・成人患者は症状が軽いため、本人が気づかないうちに乳幼児の感染源となる



百日せき、成人増加 厚労省方針、小児科以外も報告対象

6/20(火) 7:55配信

産経新聞

せきが長く続き、重症化すると死亡することもある子供の感染症「百日せき」が、成人に広がっている。厚生労働省の部会は19日、これまで限られた小児科から受けていた患者報告の対象を広げ、全国の医療機関から成人も含めた全患者の報告を受けの方針を決めた。省令を改正し、平成30年から始める予定だ。

2018年1月開始

小児科定点把握
疾患 → 臨床診断
で報告可

変更

全数把握疾患（成人
を含む） → 検査診
断が必要

正確なサーベイランスはワクチン接種プログラムの見直しに重要です

百日咳の届出には検査診断が必須

<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-23.html>

感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について

21 百日咳

(1) 定義

Bordetella pertussis によって起こる急性の気道感染症である。

(2) 臨床的特徴

潜伏期は通常5～10日(最大3週間程度)であり、かぜ様症状で始まるが、次第に咳が著しくなり、百日咳特有の咳が出始める。乳児(特に新生児や乳児早期)ではまれに咳が先行しない場合がある。

典型的な臨床像は、顔を真っ赤にしてコンコンと激しく発作性に咳込み(スタッカート)、最後にヒューと音を立てて息を吸う発作(ウーブ)となる。嘔吐や無呼吸発作(チアノーゼの有無は問わない)を伴うことがある。血液所見としては白血球数増多が認められることがある。乳児(特に新生児や乳児早期)では重症になり、肺炎、脳症を合併し、まれに致死性的となることがある。

ワクチン既接種の小児や成人では典型的な症状がみられず、持続する咳が所見としてみられることも多い。

(3) 届出基準

ア 患者(確定例)

医師は、(2)の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から百日咳が疑われ、かつ、(4)により、百日咳患者と診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を、7日以内に行わなければならない。ただし、検査確定例と接触があり、(2)の臨床的特徴を有する者については、必ずしも検査所見を必要としない。

イ 感染症死者の死体

医師は、(2)の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、百日咳が疑われ、かつ、(4)により、百日咳により死亡したと判断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を、7日以内に行わなければならない。

(4) 届出のために必要な検査所見

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	鼻腔、咽頭、気管支などから採取された検体
PCR法による病原体の遺伝子の検出	
抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇、又は単一血清で抗体価の高値)	血清

※ PCR法はLAMP法などを含む。



[▶ 百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン\(初版\)](#)

届出票(PDF:111KB)

届出基準・届出用紙の記入方法の詳細は「医師届出ガイドライン」を参照

百日咳の届出基準

ア 患者（確定例）

- 臨床症状 + 百日咳検査陽性
- 臨床症状 + 検査確定例との疫学的リンクあり

イ 感染症死亡者の死体

- 百日咳が疑われる所見 + 百日咳検査陽性

百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン（初版）

平成30年4月25日

https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/pertussis/pertussis_guideline_180425.pdf

（注）全国の百日咳の疫学情報を統一した基準で収集する目的で設定された基準。医師が臨床症状により百日咳と診断することを否定するものではない

百日咳の検査診断法

分類	方法	健康保険適用
菌培養法	百日咳菌の分離	○
遺伝子検査法	百日咳LAMP法	○
	PCR法 (IS481標的など)	×
血清診断法	抗PT IgG測定法*	○
	抗百日咳菌IgA, IgM測定法	○

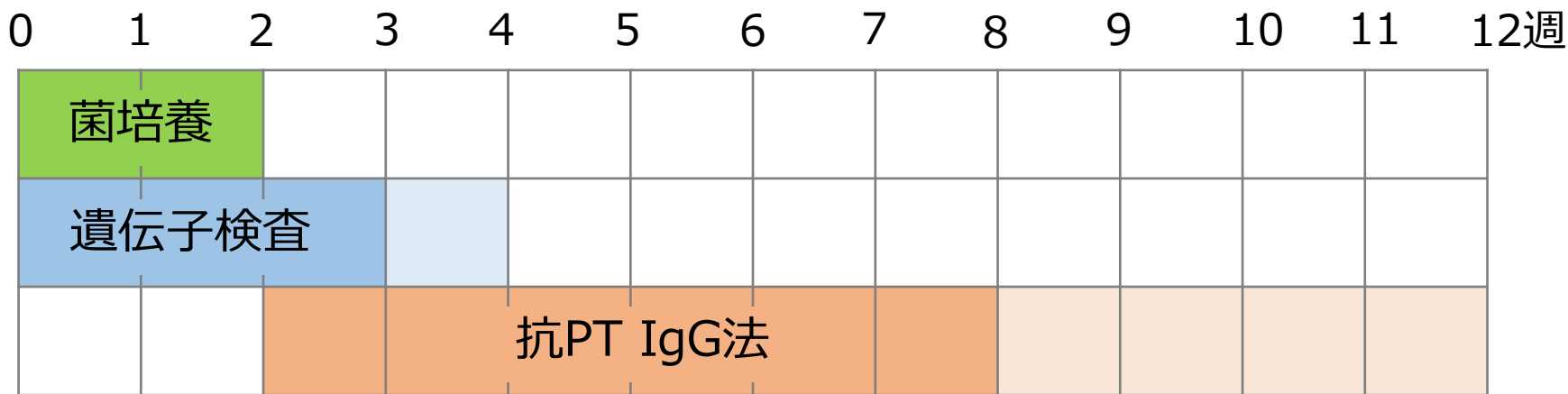
*PT: 百日咳毒素(Pertussis toxin)

現在上記いずれの方法でも陽性と判定されれば、
百日咳の届出が可能

適切な検査実施タイミング

正確な診断には適切なタイミングで検査を使い分けることが必要

咳症状



(注) 抗百日咳菌IgA, IgM法

メーカー添付文書によると「感染早期」に適用できるとのこと
海外で用いられていない検査法のため推奨時期はない

検査の進め方

検体採取



後鼻腔スワブ
(咽頭スワブ)



スワブを平板
培地に塗布

菌培養

4~5日

菌のクローン化
菌同定

2日

スワブをカザミノ酸
液500 μ l程度に懸濁
しDNA抽出

遺伝子検査

2~3日

スワブ保存は4 $^{\circ}$ C
(長期保存は-20 $^{\circ}$ C)



血清

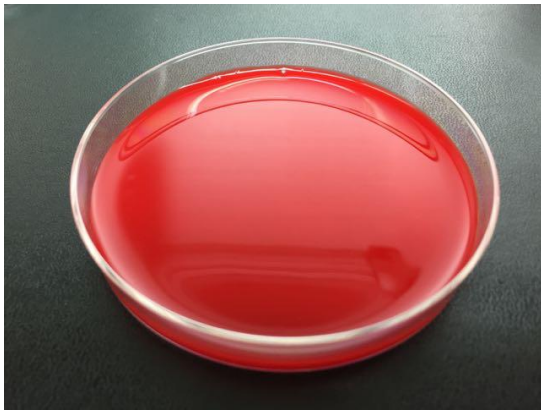
血清学的検査

1~2日

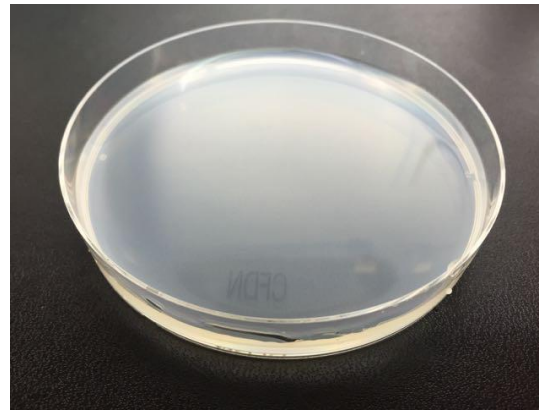
1) 菌培養検査：培養&菌同定

分離培地 雑菌の生育を抑えるため**抗菌薬**を含む

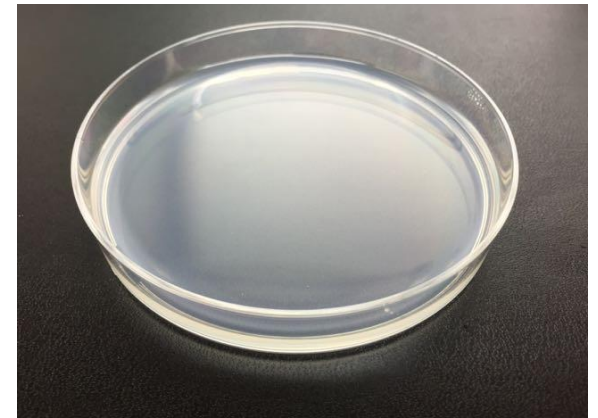
分離培地	添加抗菌薬	備考
Bordet-Gengou寒天培地 (BG培地)	20-40 µg/ml CEX	自作可能
ボルデテラCFDN寒天培地 (CFDN培地)	4 µg/ml CFDN 8 µg/ml VCM	日研生物
シクロデキストリン寒天培地 (CSM培地)	20 µg/ml CEX	自作可能
チャコール寒天培地 (CA培地)	40 µg/ml CEX	関東化学など



ボルデ・ジャング寒天培地



ボルデテラ CFDN 寒天培地 (日研生物)

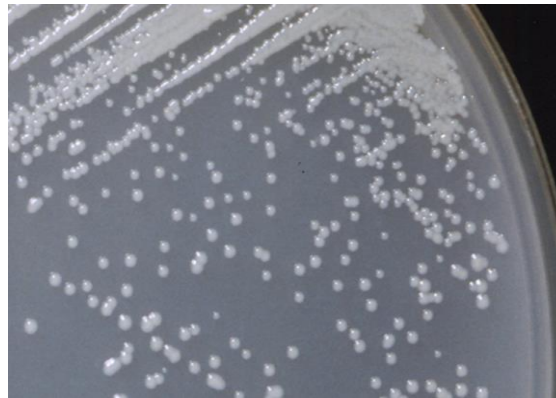
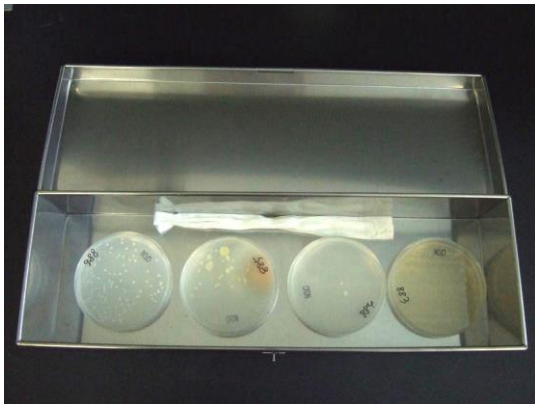


CSM寒天培地

1) 菌培養検査：培養&菌同定

培養方法

- ① 36~37℃で7日間の培養をする
- ② 湿潤条件乾燥させないように密閉容器に入れ、さらに濡れたキムワイプを入れる
- ③ 百日咳菌のコロニー形成には4~5日かかるため、培養2日以前に生育した菌は百日咳菌ではないと考えて間違いない
- ④ 培養7日目に百日咳菌様コロニーが認められない場合は、菌培養を陰性とする



菌培養の陽性率は低いため、培養検査が陰性になっても百日咳感染を否定できません

培養5日程度で直径1 mmほどの真珠様コロニーが認められる

1) 菌培養検査：培養&菌同定

菌同定

① 百日せきI相菌免疫血清「生研」



② 質量分析MALDI-TOF MS

(例) MALDI Biotyper (ブルカー・ダルトニクス社)

③ 遺伝子検査

(例) 百日咳LAMP法 (栄研化学)

4PlexリアルタイムPCR法

16S rDNA sequencing



2) 遺伝子検査：LAMP法



Loopamp® 百日咳菌検出試薬キットD

栄研化学, Cat#LMP542
48テスト分
2~8℃保存12カ月間有効

百日咳毒素遺伝子のプロモーター領域(*ptxP*)を特異的に増幅します

DNA抽出

まぜる

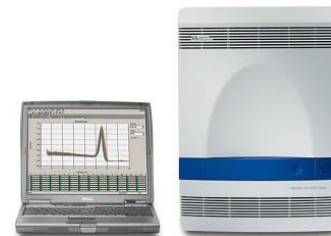
温める

検出する

(66°C, 40分)

- 百日咳菌を特異的に検出する
- 感度が高い (6.25 copy/test)
- 検査が簡単, 迅速 : 保菌量の多い小児患者は1日で検査可能

2) 遺伝子検査：PCR法



(例) 4PlexリアルタイムPCR法

使用機器：Applied Biosystems 7500 FastリアルタイムPCRシステム

反応組成：20 μ l (2xPremix Ex Taq, 10 μ l; 50xROX dye, 0.2 μ l; DNA template, 2 μ l; Primer mix, 2 μ l)

反応温度：95°C 10s, 40 cycles (95°C 3s, 60°C 30s)

	IS481* (FAM)	IS1001 (NED)	<i>recA</i> (VIC)	<i>atpD</i> (Cy5)
百日咳菌	+	-	-	-
パラ百日咳菌	-	+	-	-
<i>B. holmesii</i>	+	-	+	-
肺炎マイコプラズマ	-	-	-	+

* 百日咳菌*B. holmesii*はともにIS481配列を有する

ご希望の地衛研には試薬キットを配布しています

3) 血清診断法：抗PT IgG法

(例) デンカ生研

百日せき抗体EIA「生研」48サンプル分

百日せき抗体コントロールPT (20回分)

百日せき抗体コントロールFHA (20回分)



* 血清10 μ lを添付の緩衝液2 mlで希釈して測定する



- 診断に用いるのは抗PT IgG抗体価のみ
(抗FHA IgG抗体価は診断に用いられない)
- 免疫系が十分発達していない乳児の診断には適さない
- ワクチン接種によっても抗体価が上昇するため、ワクチン効果との判別に注意する

WHOではワクチン接種から1年以内の血清診断を推奨していない

3) 血清診断法：抗PT IgG法

- 届出基準
- ① 単血清：100 EU/mL以上
 - ② ペア血清：抗体価の有意上昇
 - <10 EU/mL → ≥ 10 EU/mL
 - 10 - <100 EU/mL → 2倍以上の上昇



検査結果が誤解を招く表記になっている点に注意

検査項目	成績	単位	基準
百日咳菌抗体			
PT-IgG	H 50	EU/mL	10 未満
FHA-IgG	H 63	EU/mL	10 未満

- 「基準値：10 EU/ml未満」としている検査会社が多い
- ワクチン未接種未感染の場合、**10 EU/ml以上でワクチン免疫による防御レベル**が得られたと判断する

3) 血清診断法：抗百日咳菌IgA, IgM法

シーメンスヘルスケア・ダイアノティクス（株）

- ノバグノスト百日咳/IgA
- ノバグノスト百日咳/IgM



- IgAはPTおよびFHAに対する総IgA抗体価, IgMは全菌に対する総IgM抗体価を測定する
- LAMP法や抗PT IgG検査との同時算定ができない

シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス, 百日咳抗体測定キット
「ノバグノスト 百日咳/IgM」 「ノバグノスト 百日咳/IgA」の販売開始

プレスリリース：2016-10-21

「ワクチンの影響を受けない」

「百日咳の早期診断に貢献する」

届出基準：11.5 NTU以上（メーカー推奨値）

* 届出は百日咳IgA, 百日咳IgMが両方もしくは片方陽性的の場合

百日咳検査法のまとめ

検査法	種類	感度	特異度	備考
菌培養検査	百日咳菌の分離	×	○	事後診断（培養7日）
遺伝子検査	百日咳LAMP法	○	○	早期診断に有用
	PCR法	○	△*	保険適用なし
血清学的検査	抗PT IgG測定法	○	△	ワクチン接種の影響を受ける
	抗百日咳菌IgA, IgM測定法	×	○	感度：IgAは25-44%, IgMは29-56%

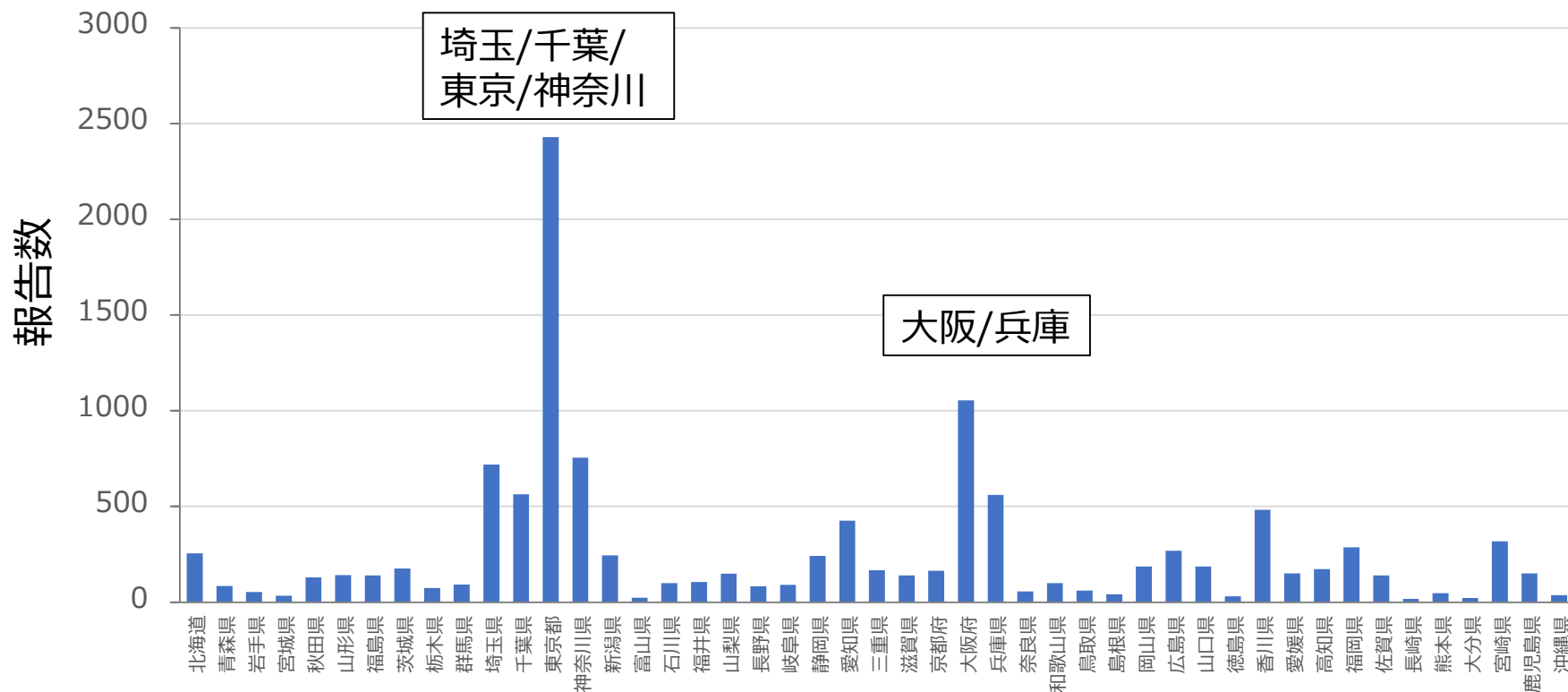
*百日咳類縁菌 (*Bordetella holmesii*, *Bordetella bronchiseptica* の一部) を検出

検査診断に基づく百日咳の 発生動向調査，2018年

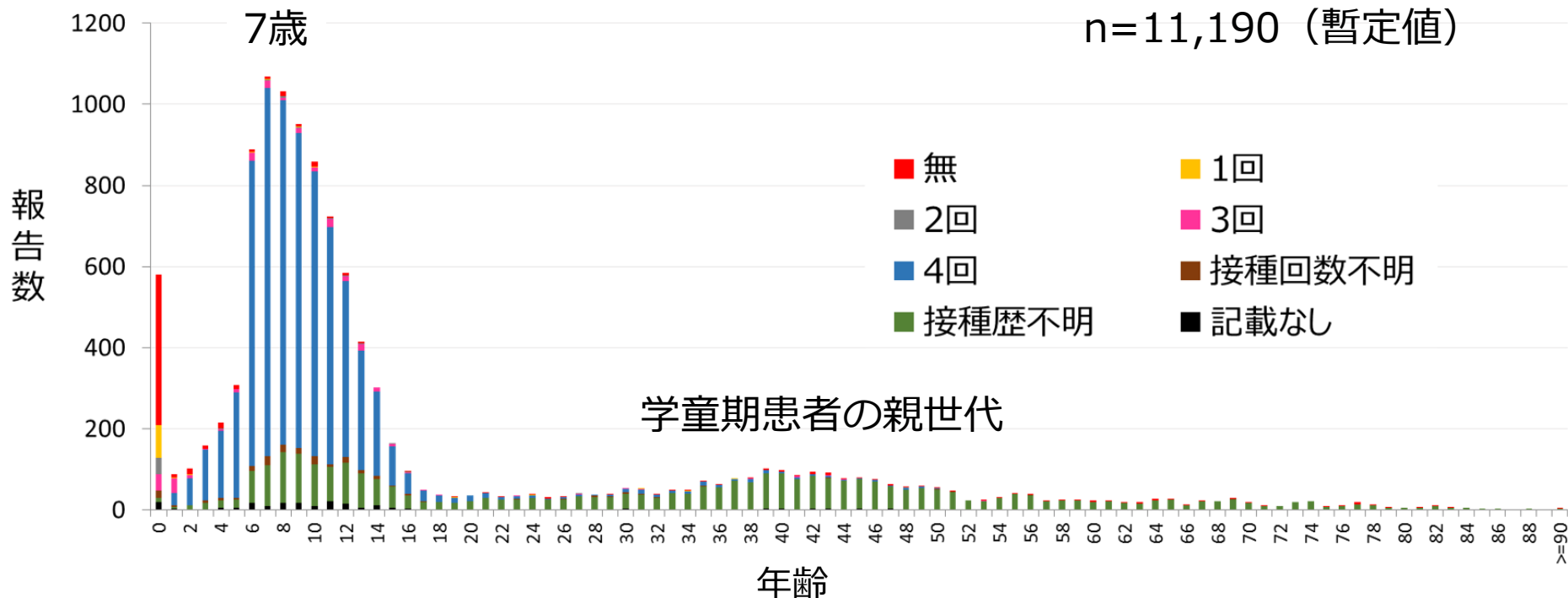


百日咳の発生動向，2018年

総報告数：11,947件（患者報告数は大都市圏が多い）



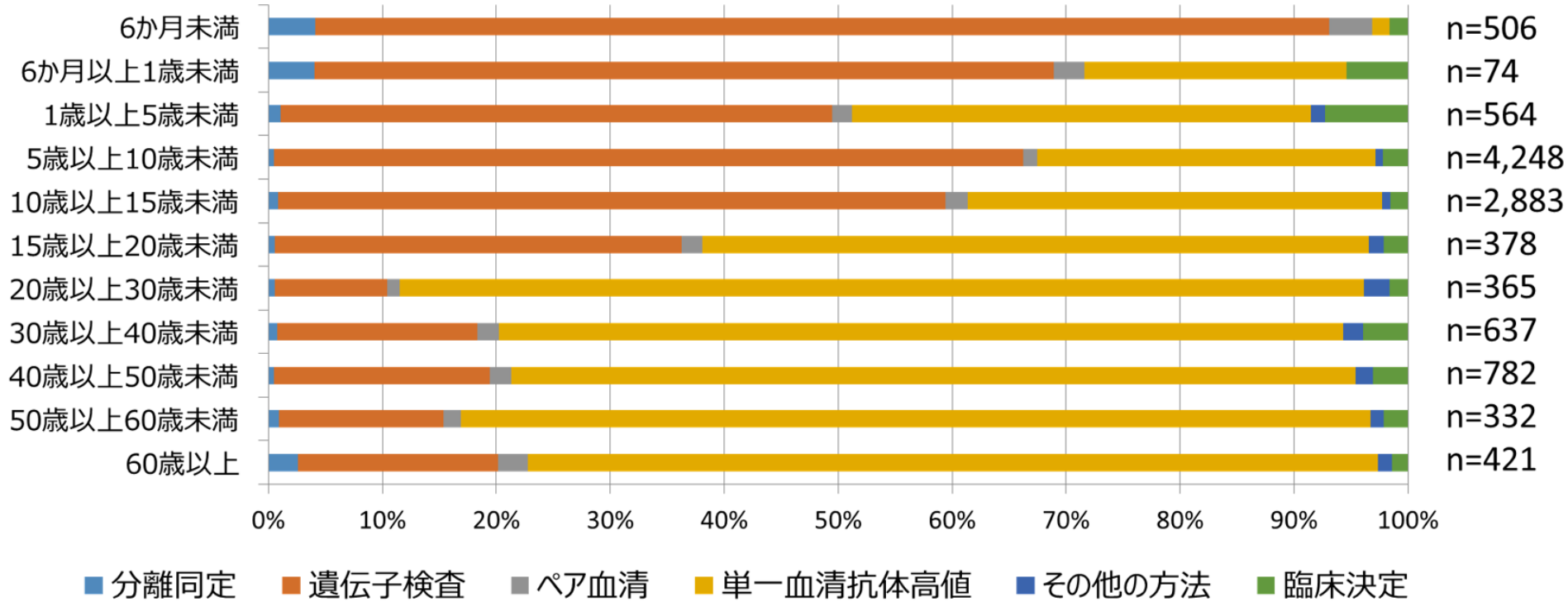
百日咳症例の年齢分布と予防接種, 2018年第1週～第52週



- <6ヶ月未満児は全報告数の5%, 5~<15歳は64%, 30~50代の成人は16%を占めた
- 5~<15歳の81%がワクチン4回接種済み

年齢群別の診断検査法の割合, 2018年第1週～第52週

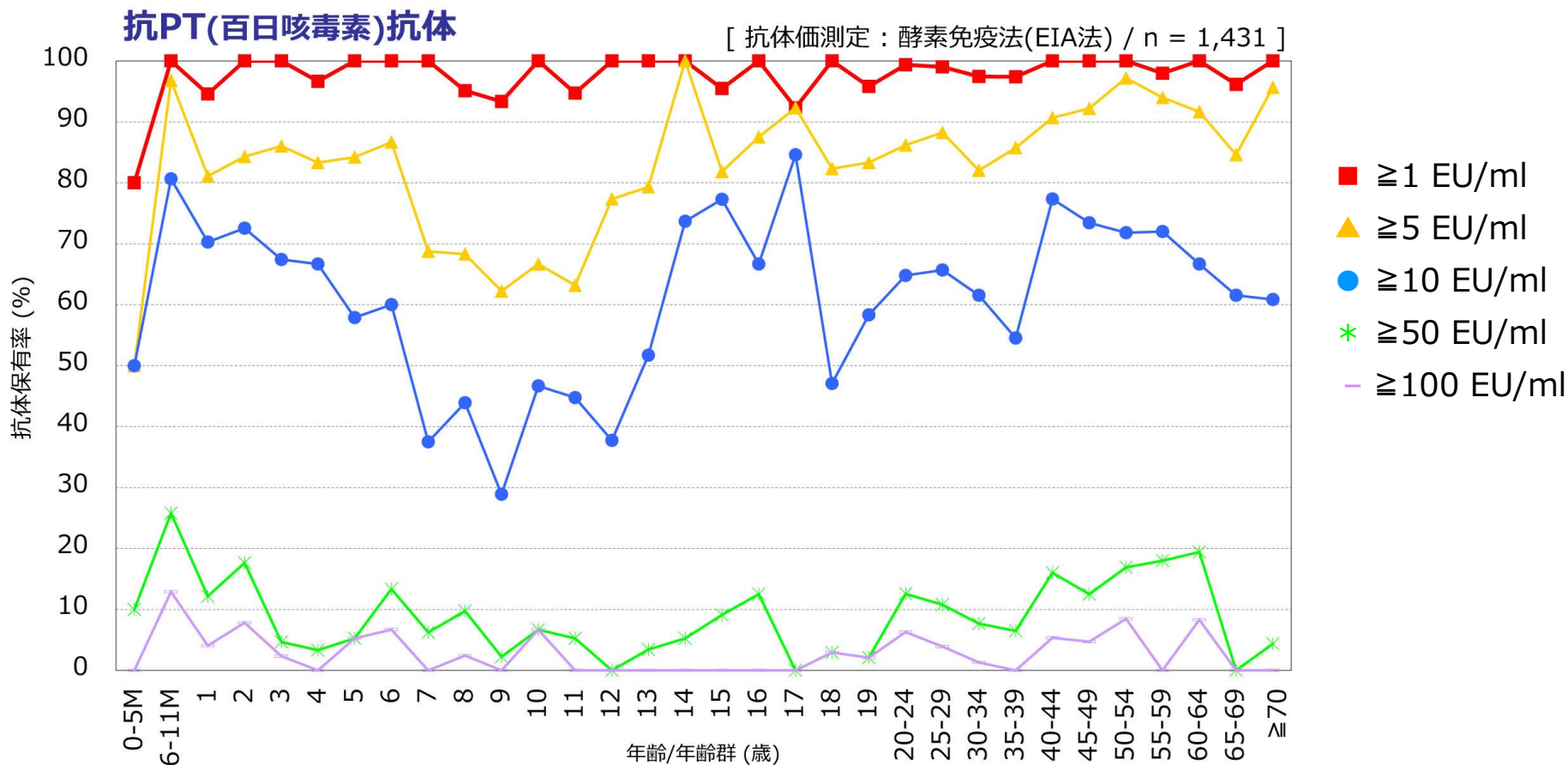
n=11,190 (暫定値)



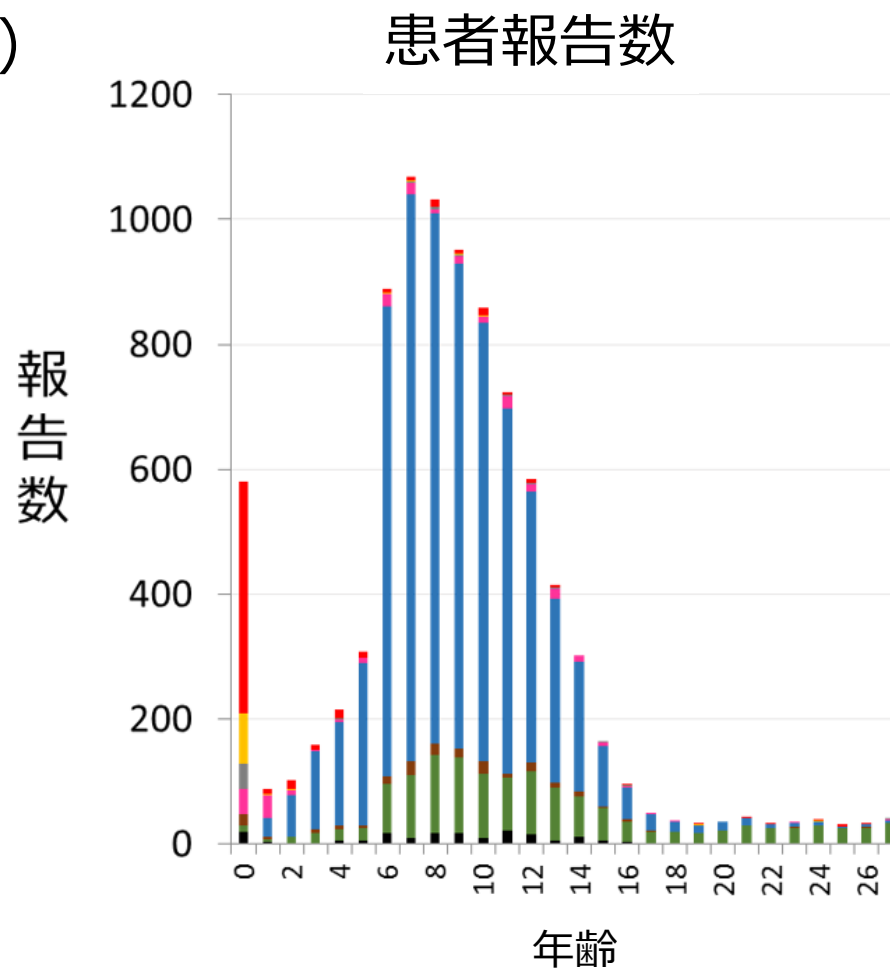
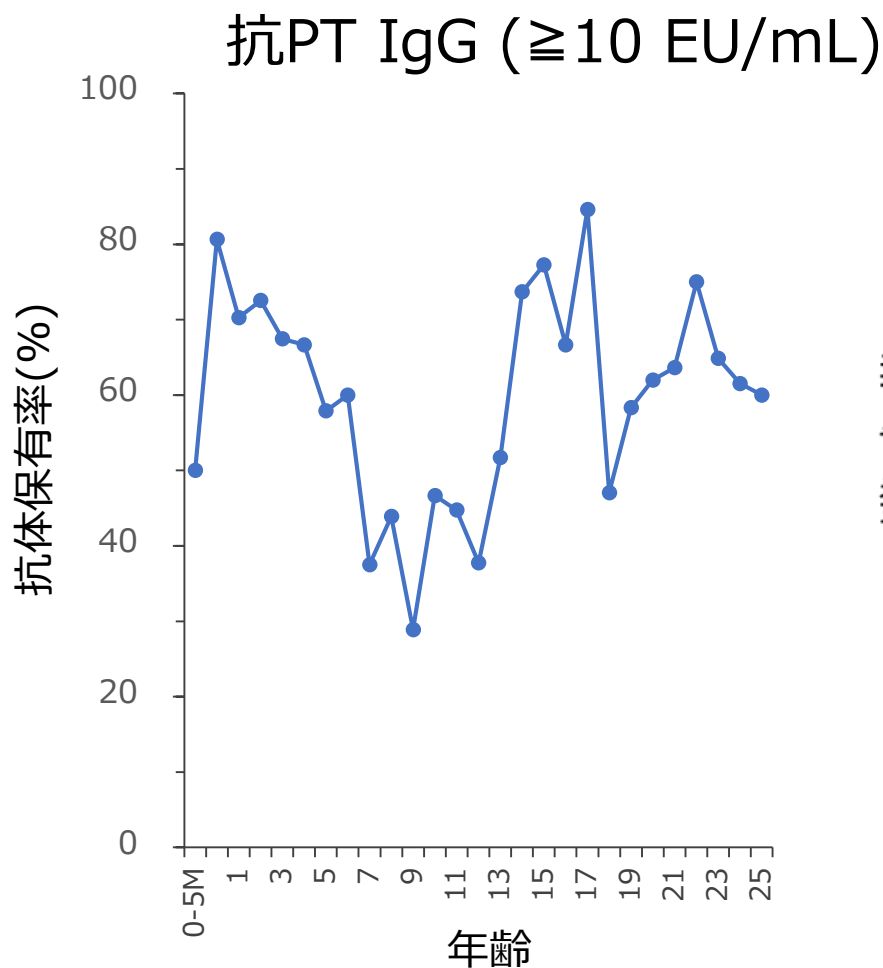
小児の診断には遺伝子検査（LAMP法），成人では単一血清を用いた血清学的検査が主に使用されている

年齢/年齢群別の百日咳抗体保有状況, 2018年

※1 主に2018年7~9月に採取された血清の測定結果：2019年5月現在暫定値



小児における抗体保有率の低下



百日咳の発生動向，2018年と2019年の比較

2019年第33週の時点で，福岡・鹿児島・静岡県では2018年の報告数をすでに超えた

2018年



2019年
(~第33週)

福岡：
286→693

静岡：242→483

鹿児島：150→606

百日咳の地域流行

- 新潟県における小中学生を中心とした百日咳の流行, 2018年 (IASR Vol. 40 p6-7: 2019年1月号)
- 富山県における小学生を中心とした百日咳の流行(IASR Vol. 38 p.25-26: 2017年2月号)
- 宮崎県における小・中学生を中心とした百日咳地域流行, 2018年 (IASR Vol. 40 p12-13: 2019年1月号)

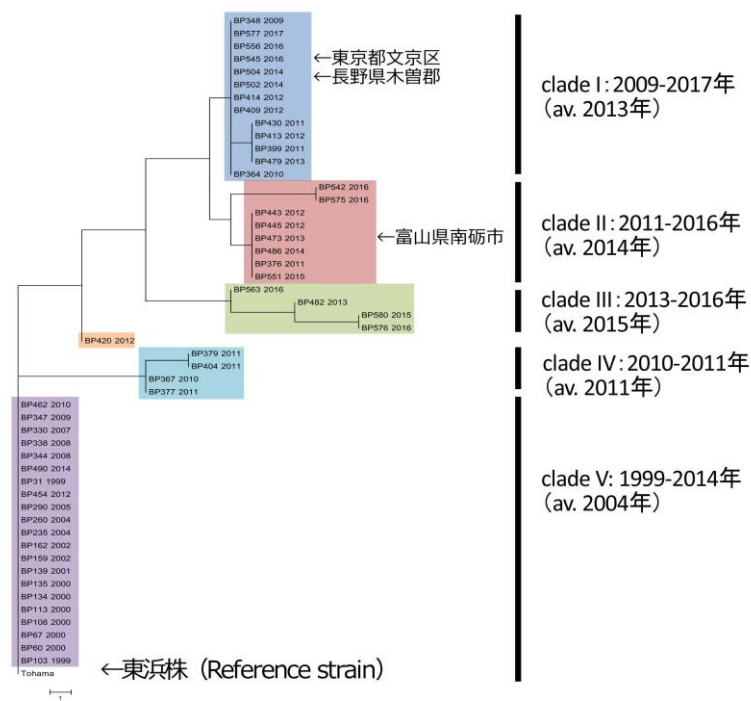


- 東京都文京区における百日咳の発生状況調査, 2016年 (IASR Vol. 38 p.28-30: 2017年2月号)
- 長野県木曾郡内での百日咳集団発生事例に関する報告 (IASR Vol. 38 p.26-28: 2017年2月号)

百日咳担当室からのお願い

遺伝子検査の導入により，感染研では百日咳臨床分離株の収集が難しくなっています。菌株が分離されたときは感染研に分与を是非お願いします。

臨床分離株は流行株の分子疫学やワクチンの評価に重要です



問い合わせ先

百日咳に関する問い合わせ・ご相談は下記までお願いします。

国立感染症研究所 細菌第二部・第一室

大塚菜緒 (notsuka@nih.go.jp)

蒲地一成 (kamachi@nih.go.jp)

TEL:042-848-7102 (直通)